

## Algin lyase, and preparing method and use thereof

**Publication number:** CN1454992

**Publication date:** 2003-11-12

**Inventor:** YU WENGONG (CN); LI JINGBAO (CN); HAN FENG (CN)

**Applicant:** CHINA OCEANOLOGY UNIV (CN)

**Classification:**

- international: C07K1/16; C07K1/34; C07K1/36; C12N1/20; C12N9/00; C12N9/88; C12P19/04; C07K1/00; C12N1/20; C12N9/00; C12N9/88; C12P19/00; (IPC1-7): C12N9/00; C07K1/16; C07K1/34; C07K1/36; C12N1/20; C12N9/88; C12P19/04

- european:

**Application number:** CN20031012273 20030516

**Priority number(s):** CN20031012273 20030516

**Report a data error here**

### Abstract of CN1454992

The preparation method of phycocolloid lyase includes the steps of preparing culture medium, sterilizing and inoculating vibro and shake fermentation in constant temp. shaker. After the obtained fermented liquor is sterilized, it is filtered by using millipore filter, then the supernatant fluid is press-filtered and concentrated to dry, then the hydrophobic chromatography can be used to remove the phycocolloid combined with product. The invented phycocolloid lyase activity is high, the reaction condition for producing alginic oligosaccharide by using it is moderate, and its reaction time is short and temp. stability is good, under the condition of pH5-10 it is stable, and it has specificity for substrate and product, can be specifically used as culture medium in preparation of polymannuronic acid.

-----  
Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 9/00

C12N 9/88 C12N 1/20

C07K 1/36 C07K 1/34

C07K 1/16 C12P 19/04



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03112273.6

[43] 公开日 2003 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 1454992A

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03112273.6

[71] 申请人 中国海洋大学

地址 266003 山东省青岛市鱼山路 5 号

[72] 发明人 于文功 李京宝 韩 峰 路新枝

宫倩红

[74] 专利代理机构 青岛海昊专利事务所

代理人 崔清晨

权利要求书 1 页 说明书 2 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种新的褐藻胶裂合酶及其制备方法和应用

[57] 摘要

一种褐藻胶裂合酶的制备方法，包括配制培养基，灭菌后接入弧菌，然后在恒温摇床振荡发酵，其特征是将所得发酵液除菌后用微孔滤膜过滤，对上清液进行压滤浓缩至干，再用疏水层析除去与产品结合的褐藻胶。优点是本发明中的褐藻胶裂合酶活力高，用它生产褐藻寡糖需要的反应条件温和，作用时间短；温度稳定性好，并在 pH5-10 的条件下均很稳定；具有底物和产物专一性，专一作用于多聚甘露糖醛酸制备方法中培养基，配制简单，发酵液中杂蛋白含量少，分离无需其它化学试剂，直接采用微孔滤膜过滤，简单快捷，成本低。

ISSN 1008-4274

1. 一种新的褐藻胶裂合酶，其特征是来源于海洋弧菌，分子量为 28.5kD，该酶的最适反应温度为 40℃，最适 pH 为 7.1。
2. 一种褐藻胶裂合酶的制备方法，包括配制培养基，灭菌后接入弧菌，然后在恒温摇床振荡发酵，其特征是将所得发酵液除菌后用微孔滤膜过滤，对上清液进行压滤浓缩至干，再用疏水层析除去与产品结合的褐藻胶。
3. 如权利要求 2 所述的制备方法，其特征是所述的微孔滤膜孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$ ，所述的对上清液进行压滤浓缩的温度为室温或 4℃ 的低温。
4. 如权利要求 2 所述的制备方法，其特征是所述的疏水层析柱使用 0.5—1.0mol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  水溶解上，并用水洗脱。
5. 如权利要求 2 所述的制备方法，其特征是培养基含有褐藻酸钠、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$ ，它们的重量比例为 1 : 0.01—0.04 : 0.01—0.04 : 0.1—0.4 : 0.3—1.0 : 0.5—2 : 1—3。
6. 如权利要求 2 所述的制备方法，其特征是所述的弧菌为 *Vibrio* sp. QY102，它的接入量与培养基的重量比为 1—10: 100。
7. 如权利要求 2 所述的制备方法，其特征是灭菌温度为 115—121℃，时间为 15—30 min。
8. 用本发明中的褐藻胶裂合酶将褐藻胶酶解生产褐藻寡糖。

## 一种新的褐藻胶裂合酶及其制备方法和应用

### 技术领域

本发明涉及一种新的褐藻胶裂合酶及其制备方法和应用。

### 背景技术

褐藻胶是由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸和  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接形成的线形阴离子多糖。上述两种糖醛酸均一或交替排列，均一排列的褐藻胶片段包括聚甘露糖醛酸(PM)和聚古罗糖醛酸(PG)。褐藻胶来源丰富，并已广泛应用于食品、化工和医药业等。近几年来，随着褐藻寡糖的生理作用不断被发现，由褐藻胶制备褐藻寡糖引起了人们更大的关注。目前普遍用酸水解法由褐藻胶制备褐藻寡糖，该方法需要在强酸环境中进行，工艺条件不易控制，裂解的产物分子量不均一，并且重复性差，从而严重阻碍了褐藻寡糖的开发与利用。所以酶解法就越来越受到人们的重视，而该方法的使用的首要条件就是要又一种活性高，易保存并且有一定的产物专一性的褐藻胶裂合酶，以提高褐藻寡糖的产率。

在一般的褐藻胶裂合酶的制备方法中，经常采用硫酸铵分级沉淀或凝胶色谱等方法，并且最后进行离心冷冻干燥，这些制造方法的缺点是试验步骤复杂，流程长，成本高。另外，在制备该类褐藻胶裂合酶的纯化过程中，原料褐藻胶与产物酶往往结合导致最终产物产率过低，这更是现有的制备方法急待解决的问题。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种新的褐藻胶裂合酶及其制备方法和应用，该酶在性质上有其独特之处，能弥补现有技术的上述不足。

一种新的褐藻胶裂合酶，其特征是来源于海洋弧菌，分子量为 28.5kD，该酶的最适反应温度为 40℃，最适 pH 为 7.1。

一种褐藻胶裂合酶的制备方法，包括配制培养基，灭菌后接入弧菌，然后在恒温摇床振荡发酵，其特征是将所得发酵液除菌后用微孔滤膜过滤，对上清液进行压滤浓缩至干，再用疏水层析除去与产品结合的褐藻胶。

用本发明的方法制得的褐藻胶裂合酶将褐藻胶酶解生产褐藻寡糖。

本发明的优点是：1. 本发明中的褐藻胶裂合酶活力高，生产褐藻寡糖需要的反应条件温和，作用时间短；2. 本发明中的褐藻胶裂合酶温度稳定性好，-20℃时保存 6 个月仍能保证 95% 的活力，并在 pH5-10 的条件下均很稳定，适于长时间保藏和运输；3. 本发明中的褐藻胶裂合酶具有底物和产物专一性，专一作用于多聚甘露糖醛酸 (poly(M))，酶解产物集中在聚合度为 3-15 的褐藻寡糖；4. 本发明

中的褐藻胶裂合酶制备方法中培养基配制简单, 发酵液中杂蛋白含量少, 分离无需其它化学试剂, 直接采用微孔滤膜过滤, 简单快捷, 成本低; 5. 本发明中的疏水层析有效地除去了产品中多余的褐藻胶, 使最终酶产率得以大幅提高。

附图说明及具体实施方式:

附图1为本发明的褐藻胶裂合酶的SDS-PAGE图谱;

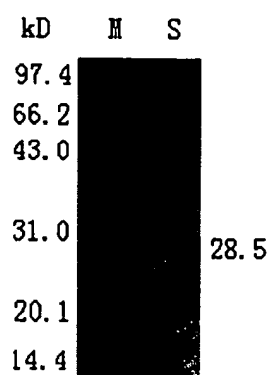
附图2为本发明的褐藻胶裂合酶的相对活性与温度的关系图。

附图3为本发明的褐藻胶裂合酶的相对活性与pH的关系图。

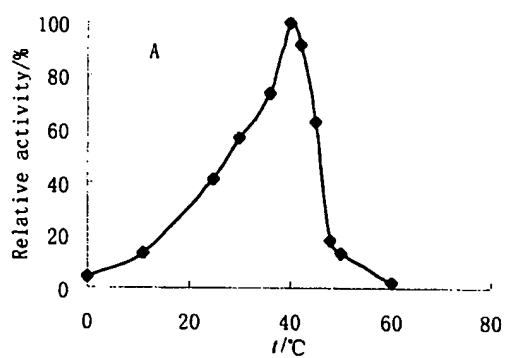
按本发明的方法制备褐藻胶裂合酶时, 先配制培养基, 灭菌后接入弧菌, 然后在恒温摇床振荡发酵, 所述的培养基由褐藻酸钠、MgSO<sub>4</sub>、FeSO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、NaCl, 它们的重量比例为1:0.01—0.04:0.01—0.04:0.1—0.4:0.3—1.0:0.5—2:1—3。本实施例中各组份的重量份数依次为1、0.01、0.01、0.2、0.5、1、3。灭菌温度为115—121℃, 时间为15—30 min。所述的弧菌为 *Vibrio* sp. QY102, 它与培养基按5—10:100重量比接种量接种, 然后在25—37℃下以200 r/min发酵培养15—20小时, 再将所得发酵液在4℃10000 g—12000g, 离心10 min除菌体。选用孔径为0.22 μm或0.45 μm的微孔滤膜, 在室温或4℃的低温对上清液进行压滤浓缩至干, 用1/10体积0.5—1.0mol/L的(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液溶解, 离心除去沉淀后上疏水层析柱, 用水洗脱即得褐藻胶裂合酶(凝胶色谱纯)。酶活约2000-3000单位/毫升。

本发明中的褐藻胶裂合酶以十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测分子量, 结果如图1, 纯化后的酶在电泳凝胶上显示为单一条带, 其分子量为28.5kD(千道尔顿)。在不同的温度及pH条件下测定其酶活力, 结果如附图2和附图3, 该褐藻胶裂合酶最适反应温度为40℃, 最适反应pH为7.1。分别用聚甘露糖醛酸(poly(M))和聚古罗糖醛酸(poly(G))为底物检测该褐藻胶裂合酶的活性, 表明该酶具有专一作用于多聚甘露糖醛酸(poly(M))的活性。该褐藻胶裂合酶在-20℃下保藏半年, 活性保持95%以上。

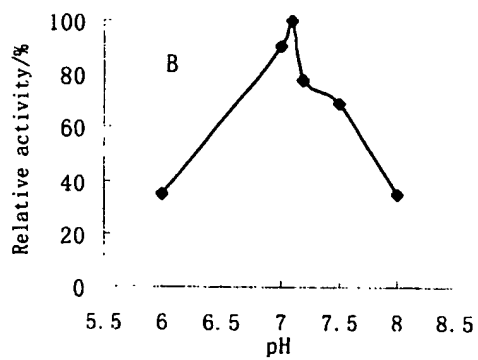
用本发明中的褐藻胶裂合酶由褐藻胶生产褐藻寡糖时, 将褐藻胶(平均分子量20000)配成重量百分比浓度为0.3—1%的水溶液, 按重量比1:100的比例将褐藻胶裂合酶加入褐藻胶水溶液中, 在40℃温度下培育6—12小时, 60%—80%的产物为聚合度为3—15的褐藻寡糖。其中褐藻胶裂合酶的用量为褐藻胶水溶液的0.1-1:100(重量比), 酶解温度为35—40℃, 酶解反应时间为4—12小时。用本发明中的褐藻胶裂合酶制备褐藻寡糖, 反应条件温和, 易于控制, 产物专一, 明显优于化学和物理降解, 适合于工业化生产褐藻寡糖。



附图 1



附图 2



附图 3